



PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 290 917 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(1) C 12 P 21/00
C 12 P 19/00
C 12 N 1/32

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 P / 336 387 0 (22) 27.12.89 (44) 13.06.91

(71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Patz, Reinhard, Dr. rer. nat.; Zirkler, Walter, Dr. rer. nat.; Steudel, Andreas, Dr. rer. nat.; Pickert, Henning, Prof. Dr. sc. nat.; Pörschmann, Stefanie, Dr. rer. nat.; Klein, Ingrid; Uhlig, Hilde, Dipl.-Biol.; Schatter, Ursula, DE
(73) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, AG Patentwesen, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE
(74) siehe (73)

(54) Verfahren zur Erzeugung von biogenen extrazellulären Flockungsmitteln

(55) Bioflockungsmittel; Biopolymere; Kultivierung; Bakterien; *Methylobacterium rhodesianum*; Biomassehydrolysat
(57) Die Erfindung betrifft die Herstellung eines neuen Bioflockungsmittels mittels Bakterien, wobei ein neuer Stamm von *Methylobacterium rhodesianum* Verwendung findet. Durch dessen Kultivierung unter zumindest Teilstubstitution des herkömmlichen Wachstumsubstrats Methanol durch chemisch-thermisches Hydrolysat von Bakterienbiomasse, vorzugsweise von Belebtschlamm, können Bioflockungsmittel mit einer Ausbeute bis zu 0,4 g/g BTS im Neutralbereich bereitgestellt werden.

ISSN 0433-6461

17 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erzeugung von biogenen Flockungsmitteln durch Kultivierung von Bakterien unter Verwendung von Biomassehydrolysat als einzige Nährstoffquelle, dadurch gekennzeichnet, daß der neue Stamm *Methylobacterium rhodesianum* IMET 11401 unter zumindestens Teilsubstitution des Wachstumssubstrates durch chemisch-thermisches Hydrolysat von Bakterienbiomasse kultiviert wird.
2. Verfahren nach 1., gekennzeichnet durch, die Verwendung eines Biomassehydrolysates, welches beim pH-Wert > 8 und im Temperaturbereich von 80 bis 170°C gewonnen wurde.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung eines Bioflockungsmittels, welches z.B. zur Aufkonzentrierung von Sedimentstoffen und insbesondere Biomassen, vorzugsweise für die Abwasserreinigung, einsetzbar ist.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Es sind verschiedene Verfahren bekannt, Flockungsmittel mikrobieller Herkunft zu gewinnen. Derartige Flockungsmittel werden für verschiedene Anwendungsbereiche vorgesehen, beispielsweise die Wasseraufbereitung, den Einsatz für medizinische Zwecke, die Papierproduktion u.ä. Die verwendeten Mikroorganismen, Pilze und Bakterien weisen ein großes Spektrum hinsichtlich ihrer taxonomischen Zugehörigkeit auf, und die flockulativ wirkenden Verbindungen selbst sind entweder nicht näher hinsichtlich ihrer Natur charakterisiert, oder werden als Proteine, Polysaccharide oder auch Fettsäuren angegeben. In den meisten bekannten Fällen ist die Herstellung der Bioflockungsmittel mit erheblichen Problemen behaftet. So ist der Kultivierungsprozeß meist mit geringen Raum-Zeit-Ausbeuten verbunden, die erforderlichen Reinsubstrate für Wachstum und Produktbildung belasten die Prozeßökonomie maßgeblich, und für die Produktgewinnung sind aufwendige Aufarbeitungsoperationen erforderlich. Bekannte Verfahren kommen für eine technische Anwendung des Flockungsmittels, z.B. in der Abwasserreinigung, deshalb nicht in Betracht.

Es ist ein Verfahren bekannt, in dem Bakterien der Art *Acetobacter methanolicus* kultiviert und die Ausschüttung von flockungaktiven Biopolymeren durch P-Limitation induziert wird. Mit diesem Verfahren kann ein Teil der beschriebenen Nachteile des Standes der Technik umgangen werden. Allerdings verlangen die produktbildenden Bakterien während ihrer Kultivierung einen solchen pH-Bereich, was für eine spätere Verwendung des Bioflockungsmittels in der Abwasserreinigung nachteilig ist, wenn man nicht gereinigtes Produkt, sondern produkthaltige Kulturlösigkeit direkt einsetzen will. Des Weiteren ist die Verwendung von Methanol als Substrat für die Kultivierung der beanspruchten Bakterien erforderlich, was die Ökonomie stark belastet. Eine wenigstens teilweise Substitution des Substrates durch enzymatisch erzeugte Biomassehydrolysate, wie es in US 4.041.182 für die Kultivierung von Bakterienmischpopulationen beschrieben wurde, ist bei diesen Bakterien nicht möglich, weil sie außer Glucose und Methanol keine weiteren C-Quellen verwerten. Letztlich ist auch die Produktivität der Produktbildung für eine industrielle Nutzung des Verfahrens noch nicht ausreichend hoch.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, mikrobielles Flockungsmittel unter Nutzung eines billigen Substrates mit hoher Ausbeute herzustellen.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, solche Mikroorganismen für die Herstellung von extrazellulären Bioflockungsmitteln zur Verfügung zu stellen und einzusetzen, die unter Nutzung von Biomassehydrolysaten als eine Nährstoffquelle im Neutralbereich kultiviert werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, indem der neue Bakterienstamm *Methylobacterium rhodesianum* IMET 11401 unter zumindestens Teilsubstitution des Wachstumssubstrates durch chemisch-thermisches Hydrolysat von Bakterienbiomasse kultiviert wird.

Der neue Bakterienstamm wurde in der Kulturensammlung des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der AdW der DDR hinterlegt. Die Kultivierungsbedingungen sind durch einen pH-Bereich von 6,5 bis 7,3 und einen Temperaturbereich von 25 bis 40°C, vorzugsweise 32°C, gekennzeichnet. Er weist folgende Charakteristika auf:

Zellmorphologie

gramnegative bis gramvariable plumpe Stäbchen ($0,8\text{--}1,2 \times 1,5\text{--}4,0 \mu\text{m}$), beweglich, nicht sporenbildend, Zellen oft verzweigt und pleomorph, häufig Einschlüsse von PHB enthaltend

Koloniemorphologie

rosafarbene Kolonien: rund, glänzend, glattrandig, konvex, schmierige Konsistenz, Durchmesser < 0, max 1 mm (Standardagar mit Methanol); Peptonagar: orange-rote Kolonien

Physiologische Merkmale

Wachstum	streng aerob	Lipase	-
Oxidase	+	Lecithinase	-
Katalase	+	Lysin-dekarb-	-
NO ₃ -Reduktion	+	oxy-lase	-
Urease	+	Ornithin-	-
Methylrot-Reaktion	-	dekarboxylase	-
H ₂ -Bildung	-	Arginin-	-
Indolbildung	-	dihydro-lase	-
Amylase	- (+)	Erfordernis an	-
Gelatinase	-	Wachstumsfakt.	-

Das Biomassehydrolysat kann dabei sowohl aus den verwendeten Bakterien selbst gewonnen werden wie auch aus anderen kommunalen oder industriellen Biomassen, soweit sie keine inhibitorischen Substanzen enthalten, die das Bakterienwachstum beeinträchtigen. Vorzugsweise ist die Verwendung von Belebtschlamm aus kommunalen oder industriellen Abwasserreinigungsanlagen geeignet. Das Biomassehydrolysat wird aus den genannten Bakterienmassen durch Behandlung bei pH-Wert > 8 im Temperaturbereich von 80 bis 170°C gewonnen. Vorzugsweise kann eine Kurzzeiterhitzung bei 120°C und einem pH-Wert von ca. 12 erfolgen. Die Hydrolysate enthalten in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial niedere Amine, Peptidbruchstücke, Mono- und Oligosaccharide einschließlich Aminozucker sowie ein Gemisch unlöslicher Zellbestandteile. Letztere können vorteilhafterweise vor Verwendung des Hydrolysates abgetrennt werden. Der Vorteil der thermisch-chemischen gegenüber der enzymatischen Hydrolyse ist darin zu sehen, daß die im Bioschlamm enthaltenen Schwermetalle unter diesen Reaktionsbedingungen ausgefällt oder am Feststoff absorbiert werden und damit nach der Abtrennung der Feststoffe nicht mehr auf die Flockungsmittelbildner toxisch wirken können. Weiterhin ist die vollständige Sterilisierung des Bioschlammes und der gegenüber Enzymen und Puffersubstanzen billigere Einsatz von technischen Grundchemikalien ein erheblicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das Bakterienhydrolysat kann das für den Bakterienstamm geeignete herkömmliche Substrat Methanol teilweise oder auch völlig substituieren, wobei ggf. ein Bilanzausgleich des C/N-Verhältnisses erforderlich sein wird. Unter sonst unveränderten optimalen Wachstumsbedingungen erfolgt die Ausschüttung der Biopolymeren ohne die üblicherweise erforderliche Limitation eines Nährstoffanteils. Die extrazellulären Biopolymeren sind wasserlöslich. Sie liegen teilweise in aggregierter Form mit einem Knäudeldurchmesser von > 0,4 µm vor. Der Gehalt an Aminogruppen am Kohlenhydratmolekül schwankt zwischen 2 und 16%. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können unter Nutzung eines billigen Sekundärsubstrates Bioflockungsmittel im Neutralbereich hergestellt werden, die vorzugsweise in der Abwasserreinigung zum Einsatz gelangen können, wobei das anfallende Kulturmedium ohne weitere Aufarbeitungsschritte eingesetzt werden kann. Der Gehalt an Bioflockungsmitteln kann bis zu 0,4 g/g BM betragen und ist damit deutlich höher als für bisher bekannte Verfahren.

Aus dem Kulturmedium kann das Bioflockungsmittel auf herkömmliche Weise, z.B. durch Ausfällung mit Isopropanol, Filtration und Trocknung, gewonnen werden.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele**Beispiel 1:**

Bakterien von *Methylobacterium rhodesianum* IMET 11401 werden bei 32°C und einem pH-Wert von 6,2-6,8 diskontinuierlich fermentiert. Als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle werden Bioschlammhydrolysat und Methanol verwendet. Das Bioschlammhydrolysat wird durch Kurzzeiterhitzung bei 150°C und einem pH-Wert von 12 aus Sekundär-Überschüßschlamm und anschließendem Abtrennen der Feststoffe gewonnen. Das Hydrolysat hat ein C:N-Verhältnis von ca. 4,6:1. Da dieses Verhältnis für ein Wachstum der Mikroorganismen bzw. eine Ausschüttung von Exopolysacchariden unzureichend ist, muß durch Zugabe von Methanol ausgeglichen werden (1 Teil Belebtschlammhydrolysat = 0,14 Teile Methanol – 100 Vol.-%).

Nach einer Züchtungsdauer von 72 h werden die von den Mikroorganismen in das Prozeßwasser ausgeschiedenen Flockungsmittel über eine Membranzelle durch Querstrom-Mikrofiltration abgetrennt. Die mikroorganismenhaltige Suspension wird dabei zwischen Fermentor und Membranzelle im Kreislauf geführt. Nachdem die Masse des Fermentorinhaltens um 33% gefallen ist, wird die Abführung des Flockungsmittels unterbrochen und mit einem Substratgemisch, bestehend aus Methanol und Hydrolysat, wieder aufgefüllt.

Die alternierenden Prozesse Substratzuführung und Flockungsmittelentnahme können beliebig oft wiederholt werden. Das Flockungsmittel wird aus dem Prozeßwasser mit Hilfe von Iso-Propanol ausgefällt, abfiltriert und getrocknet. Die erreichten Konzentrationen an Flockungsmitteln betrugen ca. 250 mg KH/l bzw. 120 mg KH/g BTS.

Beispiel 2:

Die Bakterienkultur IMET 11401 wird kontinuierlich im Verweilzeitbereich von 8 bis 10 Stunden fermentiert. Die anorganische Nährlösung hat folgende Zusammensetzung:

Verbindung	Bedarf Element in mg/g BTS
KCl	10
H ₃ PO ₄ (80%)	20
MgSO ₄ × 7H ₂ O	2,5
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,2
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,337
ZnCl ₂	0,154
MnSO ₄	0,464
CoSO ₄ × 7H ₂ O	0,0075

$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,0228
$\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0,015
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,1499
H_3BO_4	0,225
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,0163

Als C-Quelle diente Methanol. Die Rest-P-Konzentration wird so gesteuert, daß sie alternierend limitiert bzw. im Überschuß vorliegt. Die Fermentationssuspension wird im Außenkreislauf über eine Membran gepumpt, die das wässrige Medium mit dem Flockungsmittel passieren lässt und die Biomasse zurückhält. Die Biomasse wird teilweise zurückgeführt und teilweise abgetrennt.

Das Flockungsmittel wird durch Fällung, Filtration und Trocknung gewonnen.

Die erreichten Flockungsmittelkonzentrationen lagen bei 650 mg KH/l bzw. 116,5 mg KH/g BTS.